

ВЛИЯНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ, ПОВЕДЕНИЕ И СПОСОБНОСТЬ К ПАРТЕНОГЕНЕЗУ

Филипоненко Надежда Савельевна

*младший научный сотрудник, кафедра генетики и цитологии,
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
г. Харьков, Украина*

Салов Александр Викторович

*младший научный сотрудник, кафедра генетики и цитологии,
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
г. Харьков, Украина*

Воробьева Людмила Ивановна

*к. б. н., профессор, заведующий кафедрой генетики и цитологии,
декан биологического факультета,
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
г. Харьков, Украина
E-mail: filiponenko@bk.ru*

Вопрос о связи морфологических признаков с показателями количественных признаков является интересным не только в теоретическом отношении, но также и в практическом. Результаты этих исследований можно применять в селекции, подбирая для скрещивания особей с такими признаками (или такой экспрессивностью определенного признака), чтобы их потомки были максимально жизнеспособны. В данной работе изучали влияние морфологических мутаций тутового шелкопряда на жизнеспособность. Анализировали действие, в основном, тех мутаций, которые были обнаружены и выделены нами при разведении пород тутового шелкопряда. Таким образом, мы оценивали последствия наличия/отсутствия морфологической мутации на одном генетическом фоне конкретной породы тутового шелкопряда.

Для оценки жизнеспособности (ЖСП) шелкопряда использовали показатель выхода гусениц (процент гусениц, которые вышли, от общего количества оплодотворенных яиц в кладке). Таким образом, показатель выхода гусениц (ВГ) характеризует ЖСП шелкопряда на эмбриональной стадии развития. Хороший выход личинок, будучи верным показателем благополучного развития, как правило, является также надежной предпосылкой их последующей высокой

жизнеспособности и получения качественных коконов [2]. Отмечено, что производительность и ЖСП тутового шелкопряда зависит от количества яиц в кладке — из кладок, которые имеют наибольшее количество качественной гренy, получают наиболее жизнеспособное потомство [3]. Следовательно, показатель выхода гусениц имеет прогностическое значение.

Также была оценена оплодотворенность гренy (ОГ) — процент оплодотворенной гренy от общего количества гренy в кладке. Появление неоплодотворенных яиц может быть связано с аномалиями развития половой системы самок и самцов и микропилярного отверстия яйца. Неоплодотворенные яйца могут также появиться в результате влияния неблагоприятных условий среды на самок и самцов. В каждом варианте опыта проанализировано не менее 5000 яиц. Данные обработаны общепринятыми способами статистической обработки.

Относительно влияния морфологических мутаций на ЖСП данного организма, то работ, посвященных этому вопросу, практически нет. Исключением является исследование В. А. Струнникова и Л. М. Гуламовой по выведению пород, меченых по полу, в которых был обнаружен негативный эффект гена white 2 на ЖСП [11].

В работе также изучена способность пород и линий тутового шелкопряда из коллекции кафедры генетики и цитологии ХНУ им. В.Н.Каразина к термическому партеногенезу. Искусственный температурный партеногенез проводили по методу Б.Л.Астаурова. Критерием успешности партеногенеза в экспериментах являлась пигментация яиц, наступающая на 3–4 сутки от момента партеногенетической активации; определяли процент пигментированных яиц от общего числа яиц, подвергшихся температурной обработке.

Проведена также оценка поведенческого признака — двигательной активности самцов. Спонтанную локомоторную активность (ЛА) имаго шелкопряда оценивали индивидуально по методике открытого поля [13]. ЛА оценивали только у самцов, поскольку только они способны двигаться, находясь в состоянии полового возбуждения. Для этого специально подкладывали виргинную самку на расстоянии (15 см) во избежание полового контакта. Наблюдения проводили в течение 10 мин, определяя суммарную длину пробега самца.

Влияние окраски глаз бабочки тутового шелкопряда на жизнеспособность. Согласно литературным данным [8], цвет глаз имаго тутового шелкопряда бывает черным (норма), белым, красным, розовым; он совпадает или не совпадает с окраской гренy. В данной работе проанализирована ЖСП шелкопряда в связи с наличием гена,

который обуславливает белую окраску глаз бабочки и грены. В аутосоме X тутового шелкопряда расположены гены white 1, white 2, white 3. Эти гены контролируют триптофановый метаболизм, протекающий в виде цепи последовательных превращений: триптофан → кинуренин → 3-гидроксикинуренин → пигмент. Признак «белые глаза» был обнаружен нами в породах Маргеланская (мутация возникла спонтанно) и Советская-5 (появление мутации зафиксировано при анализе потомства особей, которые испытали влияние лазерного света, т.е., возможно, может быть индуцирована действием этого фактора), по проявлению она соответствует гену white 1 (характеристика, по [14]) — в серозных клетках нет пигмента, глаза имаго белые, отсутствует кинуренин-3-монооксигеназная активность, окраска грены наследуется по материнской линии, окраска глаз наследуется типично для рецессивных признаков). От мутантных особей были основаны линии.

При исследовании тонкой структуры гена white 1 выяснено, что мутанты по этому гену имеют делецию 9-го и 10-го экзонов в гене кинуренин-гидроксилазы, в результате чего фермент, который катализирует превращение кинуренина в 3-гидроксикинуренин, является дефектным [15].

Отметим, что хотя лазерное излучение обычно не относят к списку мутагенов, мутагенный эффект этого фактора, как отмечают некоторые исследователи, все же возможен. Лазерное излучение при определенных дозах и конкретном физиологическом состоянии организма может приводить к стимуляции или угнетению системы репарации; следовательно, одним из возможных механизмов мутагенного действия данного фактора является нарушение работы репарационной системы клетки, которая приводит к реализации уже существующих повреждений генетического аппарата [4].

Что касается влияния генов white на ЖСП шелкопряда, то, как отмечалось выше, есть лишь данные работ В.А.Струнникова и Л.М.Гуламовой. Эти ученые указывают, что сниженная ЖСП непигментированных яиц (white 2) объясняется, в частности, незащищенностью их от влияния лучей дневного света; наряду с этим имеют место и общие нарушения физиолого-биохимических систем, связанные с плейотропным действием гена, — об этом свидетельствует сниженная ЖСП гомозиготных по этому гену особей на постэмбриональных стадиях, хотя в это время непигментированными являются лишь органы зрения [11]. Информации относительно влияния других генов white на ЖСП в доступной нам литературе нет.

Результаты наших исследований влияния гена white 1 на ЖСП шелкопряда представлены в табл. 1.

Таблица 1.

**Показатели выхода гусениц и оплодотворенности грены у пород
Маргеланская и Советская-5 в связи с окраской глаз имаго и
грены**

Показа- тель	Порода			
	Маргеланская		Советская-5	
	чёрные глаза, темно-серая грена	белые глаза, белая грена	чёрные глаза, грена меченая по полу	белые глаза, белая грена
ВГ, %	85,41±0,49	82,46±0,67*	35,64±1,09	43,86±1,42*
ОГ, %	95,22±0,30	99,28±0,15*	90,4±0,64	92,38±0,73**

Примечание: * — достоверность отличий между вариантами окраски $p < 0,001$
** — $p < 0,05$.

В породе Советская-5 обнаружено положительное влияние данного гена на эмбриональную ЖСП — выход гусениц повысился на 23,1% ($p < 0,001$) (здесь и дальше приведены не абсолютные, а относительные отличия показателей); оплодотворенность грены, отложенной белоглазыми бабочками, превышает оплодотворенность грены, полученной от черноглазых особей, на 2,2% ($p < 0,05$). В породе Маргеланская эффект гена white 1 иной: он вызывает снижение выхода гусениц на 3,6% ($p < 0,001$) и повышение оплодотворенности грены на 4,1% ($p < 0,001$). Таким образом, влияние гена white 1 на ЖСП отличается в пределах двух исследованных пород, то есть зависит от общего генетического фона.

Влияние окраски гусениц тутового шелкопряда на жизнеспособность. В хромосоме II тутового шелкопряда расположен ген p^+ (2-0,0), который отвечает за проявление рисунка на покровах гусениц в виде «полулуний» и «маски», или его аллели: ген p — отсутствие рисунка, ген p^{Sa} — «соболья» окраска, p^S — «полосатая» («бархатная»), p^M — «ковровая» окраска, характерная для дикого шелкопряда, p^B — черная (серия множественных аллелей) [14]. Y.Tazima [16] отмечает, что в данном локусе (p -аллеля) есть еще несколько генов, и приводит следующее отношение доминирования главных аллелей локуса: $p^B > p^S \geq p^M > p^+ > p$.

Полосатая бархатная окраска характерна для гусениц породы Маргеланская. Ее обуславливает ген p^S или, согласно данным [16], один из генов S-группы (2-6,1), их проявление очень похоже, фенотипически различить их невозможно.

При инбредировании породы Маргеланская нами были обнаружены вариации в проявлении признака полосатости покровов гусениц: в пределах одной семьи получали гусениц как с темными, так и с более светлыми полосами. Такое явление впервые было зафиксировано летом 2005 г. и наблюдается до сих пор. Признаки были условно обозначены «светлые полосы» и «темные полосы». Отбор по ним был не эффективным. В доступной нам литературе мы не нашли описания этого явления.

Отметим, что появление более светлых полос на теле гусеницы обуславливает также генотип r^S/r^+ , который возникает у гибридов, полученных при скрещивании породы Маргеланская с породами, которые имеют ген r^+ (например, Советская-5 и др.). В F₂ от таких скрещиваний мы наблюдали расщепление, близкое к 1:2:1, т.е. тип взаимодействия между генами r^S и r^+ можно охарактеризовать как неполное доминирование. Признак «светлые полосы» у гусениц породы Маргеланская не обусловлен генотипом r^S и r^+ , поскольку при скрещивании таких особей в следующем поколении мы никогда не наблюдали появление гусениц с рисунком на покровах в виде «полумесяцев» и «маски», то есть с генотипом r^+ .

Появление более светлых гусениц было массовым, следовательно, вряд ли данная окраска была вызвана мутацией. Поэтому, мы предположили, что светлые и темные полосы на покровах гусениц обусловлены разным проявлением одного гена.

Вполне возможно предположить плейотропный эффект этого гена и его разные проявления не только по морфологическому признаку, но и по жизнеспособности. Поэтому была исследована связь между проявлением признака полосатости гусениц и жизнеспособностью их потомков. Ранее в экспериментах на дрозофиле нами была показана положительная корреляция между экспрессивностью морфологического признака у особей материнского поколения и ЖСП их потомков [12].

Результаты представлены в табл. 2. Из таблицы видно, что окраска гусениц родительского поколения не влияет в значительной мере на ЖСП следующего поколения (отличия между вариантами опыта незначительны, хотя и достоверны).

Возможно, отличия между вариантами данного опыта были бы большими, если бы сравнивалась ЖСП, устойчивость к неблагоприятным факторам (например, повышенной температуре) самих гусениц, которые имеют разную окраску, в связи с разным количеством пигмента меланина. Согласно данным работы [7], особи линии ebony дрозофилы, с более темной окраской тела, более теплоустойчивы, чем более светлые особи линии black, что, вероятно, связано с большим содержанием меланина в покровах линии ebony.

Таблица 2.

Показатели выхода гусениц и оплодотворенности грены у породы Маргеланская в связи с окраской гусениц родительского поколения

Показатель	Окраска гусениц	
	«светлые полосы»	«темные полосы»
ВГ, %	86,05±0,49	84,41±0,56**
ОГ, %	99,15±0,13	96,66±0,28*

Примечание: * — достоверность отличий между двумя вариантами окраски $p < 0,001$; ** — $p < 0,05$.

Во второй части этой работы мы проводили оценку ЖСП тутового шелкопряда в связи с признаком окраски гусениц, который проявляется в виде «дополнительных полулуний» на брюшных сегментах гусеницы.

Обнаруженный в партеноклонах признак «дополнительные полулуния на 3, 4 и 6 брюшных сегментах» (в дополнение к полулуниям на 2 и 5 сегментах, обычных для многих пород тутового шелкопряда, — ген p^+) авторами работы [9] был обозначен как p^{+n} . Y.Tazima приводит два гена, которые обуславливают появление дополнительных пятен на теле гусеницы, — *ms* (*multistars*: 12-15.5, дополнительные пятна на дорсальной стороне 3-7-го брюшных сегментов, количество пятен зависит от генетического фона и температуры инкубации грены) и *L* (*Multilunar*: 4-0.0, пара дополнительных пятен на каждом сегменте, количество которых также зависит от генетического фона и температуры инкубации грены).

Анализ влияния признака «дополнительные полулуния» на ЖСП был начат в 2005 г. в породе Бухарская, когда мы обнаружили массовое появление гусениц с этим признаком. У части особей породы присутствуют дополнительные полулуния — на 3-ом и 4-ом, редко на 6-ом брюшных сегментах. При скрещивании особей с данным признаком в потомстве появлялись и обычно окрашенные гусеницы, и гусеницы с дополнительными пятнами. Проявление обнаруженного нами признака отличается от описания трех вышеприведенных генов, поэтому на данном этапе исследований можно допустить, что это специфика проявления одного из них на генетическом фоне породы Бухарская, а, возможно, это новый, еще не описанный ген.

Что касается связи данного признака с другими количественными признаками шелкопряда, то в работе [6] была установлена зависимость между экспрессивностью и пенетрантностью признака, уровнем гетерозиготности и комбинационной способностью на гетерозис.

В обзорах мутаций тутового шелкопряда [8; 14; 16] отмечается, что часто мутации, связанные с количеством пятен на теле гусениц, влияют также и на ЖСП зародышей или личинок.

Таблица 3.

Показатели выхода гусениц и оплодотворенности грены у породы Бухарская в связи с окраской гусениц родительского поколения

Показатель	Окраска гусениц	
	«норма»	«дополнительные полулуния»
Бухарская (аутбредное разведение)		
ВГ, %	84,99±0,65	92,83±0,49*
ОГ, %	92,06±0,49	98,12±0,26*
Бухарская (инбридинг 7 поколений)		
ВГ, %	94,07±0,43	73,76±1,11*
ОГ, %	97,96±0,26	76,50±1,07*
Бухарская (инбридинг 10 поколений)		
ВГ, %	86,16±0,43	75,43±0,88*
ОГ, %	93,42±0,31	95,41±0,43*

Примечание: * – достоверность отличий между двумя вариантами окраски $p < 0,001$.

В данной работе было проведено исследование эмбриональной ЖСП породы Бухарская тутового шелкопряда в связи с наличием или отсутствием признака «дополнительные полулуния» у особей родительского поколения. Оценку признаков ОГ и ВГ проводили в породе при аутбредном и инбредном (степень инбридинга — 7 и 10 поколений) разведении (табл. 3).

Из данных, представленных в таблице, видно, что, в зависимости от типа разведения (аутбредного или инбредного), наличие признака «дополнительные полулуния» у родительских особей по-разному влияет на эмбриональную ЖСП шелкопряда. При аутбредном разведении породы Бухарская особи с признаком «дополнительные полулуния» дают более жизнеспособное потомство, при инбредном разведении эмбриональная ЖСП потомства от особей с данным признаком снижена. Инбридинг, в данном случае, является более мощным фактором, влияющим на жизнеспособность, по сравнению с действием исследуемой мутации. Таким образом, влияние исследуемого признака на ЖСП зависит от общего генетического фона, как и в случае с эффектом гена white 1.

Способность к термическому партеногенезу пород и мутантных линий тутового шелкопряда. При исследовании способности пород и линий тутового шелкопряда из коллекции нашей кафедры к термическому партеногенезу установлено, что максимальное значение этого показателя характерно для пород Сы-Чуан ($29,63 \pm 3,44$), линии ch — «рыжие мураши» ($19,2 \pm 2,57$) и породы Бухарская (наивысшее значение показателя среди всех пород — $51 \pm 5,83$). В породе Бухарская данный признак был оценен в нескольких вариантах: при аутбредном разведении породы, в ходе инбридинга, а также в связи с наличием/отсутствием признака «дополнительные полулуния» на брюшных сегментах гусеницы. При сравнении способности к термическому партеногенезу в двух группах особей породы Бухарская (имеющих и не имеющих этот признак) показано, что в первой группе этот показатель выше на 43% ($p < 0,05$). Инбридинг в два раза снижает эту способность у данной породы, уже при степени инбридинга 5 поколений; отличия между линиями породы, прошедшими 5, 8 и 10 поколений инбридинга, не обнаружены. Отмеченное снижение способности к партеногенезу при инбредном разведении шелкопряда согласуется с данными других работ, в которых установлена положительная корреляция между способностью к термическому партеногенезу и степенью гетерозиготности самок [1].

Влияние видимых пигментных мутаций тутового шелкопряда на локомоторную активность имаго. В работах кафедры генетики и цитологии ХНУ было показано, что видимые пигментные мутации (мутации цвета глаз, тела) влияют на поведенческие признаки дрозофилы [5; 10]. В последние годы такие исследования начаты и на другом модельном объекте — шелкопряде. В данной работе представлены результаты по анализу ЛА имаго у нескольких пород из коллекции кафедры.

Материал исследования: имаго породы Советская-5 (и линия, полученная из этой породы, характеризующаяся белой окраской глаз имаго и грены), Белогрениная (характеризуется белой окраской грены), Зеленая (салатный цвет коконов), Украинская селекционная-5 (белая окраска бабочек) и Украинская селекционная-5 (черная окраска бабочек).

Анализ уровня ЛА имаго породы Советская-5 показал, что самцы с пигментированными глазами уступают белоглазым более чем в два раза: для белоглазых характерно значение показателя $160,75 \pm 27,3$, а для черноглазых — $67,83 \pm 16,77$. Ген white 1, который обуславливает белую окраску глаз имаго, оказывает стимулирующее влияние на ЛА.

Также низкие значения показателя ЛА характерны для самцов породы Зеленая. Анализ ЛА самцов пород Белогрениная, Украинская селекционная-5, Дин-Гуан и Бухарская показал, что по данному признаку они достоверно между собой не отличаются. Ген, обуславливающий черную окраску бабочек породы Украинская селекционная-5, оказывает

стимулирующее действие на ЛА самцов — различия в значениях исследуемого показателя между породой Украинская селекционная-5 и линией из этой породы, у которой бабочки окрашены в черный цвет, достоверны, $p < 0,05$ (табл. 4).

Таблица 4.

Локомоторная активность самцов тутового шелкопряда

Порода	ЛА, см/10 мин
Белогрениная	385,75±25,4
Зеленая	157,06±18,9
Украинская селекционная-5 (белые бабочки)	355,35±40,9
Украинская селекционная-5 (черные бабочки)	421,63±29,8*
Дин-Гуан	395,73±25,0
Бухарская	414,06±42,0
Советская-5 (черные глаза)	67,83±16,77
Советская-5 (белые глаза)	160,75±27,3

Таким образом, в работе исследовано влияние ряда морфологических мутаций тутового шелкопряда на оплодотворенность грены, эмбриональную жизнеспособность, локомоторную активность имаго и способность к термическому партеногенезу. Влияние гена white 1 на ЖСП зависит от генетического фона, на котором он находится. В породе Советская-5 ген white 1 оказывает стимулирующее влияние и на локомоторную активность, и на эмбриональную ЖСП породы. Разное проявление окраски полос у гусениц породы Маргеланская (темные или светлые полосы) незначительно влияет на ЖСП следующего поколения. Наличие признака «дополнительные полулуния» у родительских особей по-разному влияет на эмбриональную ЖСП шелкопряда в зависимости от способа разведения породы. При аутбредном разведении породы Бухарская особи с данным признаком дают более жизнеспособное потомство, при инбредном разведении эмбриональная ЖСП потомства от особей без данного признака снижена. При сравнении способности к термическому партеногенезу в двух группах особей породы Бухарская (имеющих и не имеющих признак «дополнительные полулуния») показано, что в первой группе этот показатель выше на 43%. Ген, обуславливающий черную окраску бабочек породы Украинская селекционная-5, оказывает стимулирующее действие на локомоторную активность.

Список литературы:

1. Алтухов Ю.П., Клименко В.В. Положительная корреляция между уровнем индивидуальной гетерозиготности и способностью к полному термическому партеногенезу у тутового шелкопряда // ДАН СССР. 1978. Т. 239, №2. С. 460-462.
2. Астауров Б.Л., Беднякова Т.А., Верейская В.Н., Острякова-Варшавер В.П. Действие высоких температур на грену шелковичного червя. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 126с.
3. Браславский М.Е., Головкин В.А., Злотин А.З. и др. Селекция тутового шелкопряда в Украине (достижения, проблемы и перспективы). Харьков, 2002. 280с.
4. Бурилков В.К., Крочик Г.М. Биологическое действие лазерного излучения. Кишинев: Штиинца, 1989. 104с.
5. Волкова Н.Е., Воробьева Л.И. Влияние генных мутаций хромосом 1 и 2 на половое поведение *Drosophila melanogaster* // Вестник Одесского национального университета. 2005. Т.10, вып.5. С. 115-125.
6. Воробьева Л.И. Зависимость эффекта гетерозиса от уровня гетерозиготности исходных линий. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Харьк. гос. ун-т. Х., 1988. 17с.
7. Воробьева Л.И., Кулабухова Н.Н. Содержание меланина и адаптивные свойства мутантных линий // Биологический вестник. 2001. Т.5, №1-2. С. 139-142.
8. Захаров И.А. Генетические карты высших организмов. Л.: Наука, 1979. 157с.
9. Клименко В.В., Воробьева Л.И., Шахбазов В.Г. Температурный контроль степени проявления морфологического признака в партеноклонах тутового шелкопряда // Доклады АН СССР. 1980. Т.252, № 3. С. 732-735.
10. Кулабухова Н.Н., Воробьева Л.И. Роль отдельных морфологических мутаций в формировании поведенческих признаков *Drosophila melanogaster* // Вестник Харьковского университета имени В. Н. Каразина. Серия: биология. 2006. Вып.3, № 729. С. 88-92.
11. Струнников В.А., Гуламова Л.М. Искусственная регуляция пола у тутового шелкопряда. Сообщение II. Получение меченных по полу гибридов тутового шелкопряда с нормальножизнеспособными самцами // Генетика. 1971. Т.7, № 3. С. 58-70.
12. Филипоненко Н.С., Навроцкая В.В., Шеховцова Я.С., Воробьева Л.И. Связь экспрессивности признака *radius incompletus* и жизнеспособности *Drosophila melanogaster* // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія Біологія. 2008. Вип.7, №814. С. 57-64.
13. Burnet B., Conolly K. The development of locomotor activity in *Dr. melanogaster* // Heredity. 1984. Vol.52, №1. P. 63-75.
14. Doira H., Fujii H., Kawaguchi Y. et al. Mutations of *Bombyx mori* [Electronic resource]. 1997. Mode of access: www.ss.ab.a.u-tokyo.ac.jp.
15. Quan G.X., Kim I., Komoto N. et al. Characterization of the kynurenine 3-monooxygenase gene corresponding to the white egg 1 mutant in the silkworm *Bombyx mori* // Mol. Genet. Genomics. 2002. Vol.267 (1). P. 1-9.
16. Tazima Y. The silkworm: an important laboratory tool. Tokyo: Kodansha, 1978. 307p.